

## Роль внутриклеточных газовых транмиттеров сульфида водорода и оксида азота в регуляции апоптоза нормальных и бласттрансформированных клеток

*Старикова Е.Г., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Таширева Л.А., Стариков Ю.В., Степовая Е.А., Осихов И.А., Васильева О.А., Якушина В.Д.*

## The role of intracellular gaseous transmitters hydrogen sulfide and nitric oxide in apoptosis regulation of normal and cancer cells

*Starikova Ye.G., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Tashireva L.A., Starikov Yu.V., Stepovaya Ye.A., Osikhov I.A., Vasiliyeva O.A., Yakushina V.D.*

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

© Старикова Е.Г., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др.

Проведено исследование влияния доноров газов оксида азота и сульфида водорода на апоптотическую гибель клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров. Показано, что нитропруссид натрия в концентрации 100 ммоль вызывал апоптоз клеток Т-лимфобластной лейкемии после 15 мин инкубации. Донор сульфида водорода усиливал апоптотическую гибель клеток линии Jurkat при использовании его в концентрациях 10 и 100 ммоль. Воздействие доноров газов оксида азота и сульфида водорода в течение 15 мин в тех же концентрациях не сопровождалось изменениями апоптотической гибели мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров. Газовые транмиттеры NO и H<sub>2</sub>S вызывали некроз клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов после 24 ч инкубации клеток с соответствующими донорами газов.

**Ключевые слова:** газовые транмиттеры, оксид азота, сульфид водорода, апоптоз.

Investigation of influence of gases nitric oxide and hydrogen sulfide on apoptotic cell death of Jurkat cells and mononuclear leucocytes of healthy donors was conducted. It was shown that 100 mmol sodium nitroprusside increased the apoptosis of T lymphoblast leukemia cells after 15' incubation. 10 and 100 mmol donor of hydrogen sulfide caused apoptotic death of Jurkat cells after 15' incubation. 15' exposure of nitric oxide and hydrogen sulfide donors did not lead to the changes of cell death of mononuclear leucocytes. Gaseous transmitters NO and H<sub>2</sub>S increased necrosis of Jurkat cells and mononuclear leucocytes after 24 h incubation with the appropriate gas's donor.

**Key words:** gaseous transmitters, nitric oxide, hydrogen sulfide, apoptosis.

УДК 616-091.818:546.221.1:546.172.6:612.014.464

### Введение

Изучение нового класса сигнальных молекул, названных газотрансмиттерами, началось в 1986 г. с открытия эндотелиального фактора релаксации сосудов. Этим веществом оказался монооксид азота — простая неорганическая молекула (все известные до этого времени гормоны, медиаторы и нейротрансмиттеры были соединениями органической природы). Группа газовых посредников продолжает расширяться и в настоящее время включает помимо монооксида азота окись углерода CO и сульфид водорода H<sub>2</sub>S. Газо-

транмиттеры являются высокотоксичными веществами, однако, несмотря на это свойство, они продуцируются практически всеми клетками организма, что указывает на высокую значимость данных молекул в регуляции жизнедеятельности клеток, тканей и организма в целом. Определена решающая роль газовых посредников в регуляции тонуса сосудов, передаче нервного импульса, показано их кардиопротективное действие [6, 7, 12]. Нерешенным остается вопрос об участии газотрансмиттеров в регуляции клеточного гомеостаза, в частности не определена их роль в молекулярных механизмах регуляции апоптоза клеток.

В настоящее время известно, что оксид азота ингибирует апоптоз лейкоцитов, нейтрофилов, гепатоцитов, трофобластов и эндотелиальных клеток, но обладает проапоптотическим действием в отношении тимоцитов, клеток поджелудочной железы, миобластов скелетных мышц, корковых нейронов [1, 11]. Данные о влиянии  $H_2S$  на механизмы реализации апоптоза клеток также противоречивы: этот газотрансмиттер может иметь как индуцирующее, так и ингибирующее воздействие на указанный процесс [2, 3, 9]. Таким образом, направленность апоптотической реакции при действии газов определяется типом исследуемых клеток. При этом в литературе недостаточно освещены сравнительные аспекты действия оксида азота и сульфида водорода на апоптоз опухолевых и нормальных клеток.

Цель работы — идентифицировать характер апоптотического ответа «здоровых» и бласттрансформированных клеток для селективного управления программированной гибелью последних с использованием оксида азота и сульфида водорода.

## Материал и методы

При выполнении исследования клетки линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкомия) инкубировали при температуре 37 °С в полной питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот», г. Санкт-Петербург), инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/мл HEPES («Flow», Великобритания). Материалом для исследования также служила кровь, взятая у 9 здоровых доноров (3 мужчины и 6 женщин) в возрасте от 18 до 40 лет и стабилизированная гепарином (25 Ед/мл). Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови путем центрифугирования на градиенте плотности Ficoll-Paque ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ) (Pharmacia, Швеция). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах ( $2 \cdot 10^6/\text{мл}$ ) с полной питательной средой. Для определения влияния газов сульфида водорода и оксида азота на процессы реализации апоптоза в питательную среду инкубации клеток добавляли донор сульфида водорода (натрий гидросульфид гидрат, Sigma, США) и донор оксида азота (нитропруссид натрия, Sigma, США) в конечных концентрациях 10, 50, 100 и 500 ммоль. Клетки инкубировали с донорами газов в течение 15 мин и 24 ч.

С использованием проточной лазерной цитометрии (Facs Canto2 (Beckton Dickinson, США)) определяли число апоптотически- и некротически-измененных клеток в культуре линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах, для чего использовали FITC-меченый аннексин V и пропидий йодид (Beckman Coulter, Франция) соответственно. Вовлеченность клеток в процессы апоптоза и некроза в культуре выражали в процентах аннексин- и пропидий йодид-положительных клеток.

Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) оценивали с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Данные представлены в виде медианы  $Me$ , верхнего и нижнего квартилей  $Q_1$ — $Q_3$ .

## Результаты и обсуждение

Газовые трансмиттеры являются простыми химическими соединениями и синтезируются внутриклеточно. Для изучения роли и места газов в системе внутриклеточной сигнальной трансдукции были использованы специфические доноры NO и  $H_2S$  — нитропруссид натрия SNP и натрия гидросульфид гидрата NaHS соответственно [7, 11].

В результате проведенного исследования показано, что увеличение числа некротически измененных клеток в культурах клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, было зарегистрировано только при инкубации клеток с нитропруссидом натрия в концентрации 500 ммоль (табл. 1). Одной из причин некроза клеток при воздействии высоких концентраций оксида азота может быть подавление митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования [5].

При исследовании влияния NO на апоптотическую гибель клеток линии Jurkat установлено, что увеличение числа аннексин-положительных клеток происходило при инкубации клеток с SNP в течение 15 мин в концентрации 100 ммоль и достигало 16,95 (14,15—21,80)%, что достоверно превышало аналогичные показатели в контроле — 4,45 (1,45—8,50)% ( $p < 0,05$ ). Проапоптотический эффект NO некоторые авторы связывают с повышением экспрессии Fas-рецептора [8].

Таблица 1

Содержание клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов с некротическими и апоптотическими признаками после 15-минутного и 24-часового воздействия различных концентраций донора оксида азота ( $Me$  ( $Q_1—Q_3$ )))

Время воздействия	Концентрация SNP, ммоль	Содержание клеток линии Jurkat, %		Содержание мононуклеарных лейкоцитов, %	
		с некротическими признаками	с апоптотическими признаками	с некротическими признаками	с апоптотическими признаками
Интактные клетки		0 (0—0,15)	4,45 (1,45—8,50)	0,45 (0,35—0,75)	32,20 (18,80—35,40)
15 мин	10	0,30 (0,20—0,40)	5,25 (3,10—8,56)	0,05 (0—0,10)	35,60 (24,60—36,60)
	50	0,25 (0,20—9,10)	14,05 (7,85—23,00)	0	24,90 (21,90—31,60)
	100	0,40 (0,30—1,30)	16,95* (14,15—21,80)	0	25,30 (22,70—30,80)
24 ч	10	84,00** (54,60—84,40)	3,01 (0—7,70)	71,65** (65,15—81,35)	12,30* (8,95—15,55)
	50	95,80** (86,35—100)	0,40* (0—0,90)	71,60** (64,65—73,95)	5,85* (4,75—6,65)
	100	99,40** (95,40—100)	0,30* (0—0,60)	80,75** (73,65—87,05)	3,30* (2,75—4,60)

\*  $p < 0,05$  по сравнению с интактной культурой.

\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с интактной культурой.

Другой возможный путь запуска апоптоза связан со способностью оксида азота провоцировать повышение проницаемости мембраны митохондрии и выход в цитоплазму клетки апоптоз-индуцирующих факторов [5, 11]. Воздействие на клетки донора оксида азота в концентрациях 10 и 50 ммоль не сопровождалось интенсификацией апоптотической гибели клеток Т-лимфобластной лейкемии ( $p > 0,05$ ). Число аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов после воздействия на клетки SNP в концентрациях 10, 50 и 100 ммоль не изменялось ( $p > 0,05$ ) (табл. 1). Показано, что оксид азота вызывает апоптоз некоторых типов опухолевых клеток за счет инактивации транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и YY1, модуляции активности транскрипционного фактора p53 [4].

Установлено, что воздействие оксида азота в концентрации 10 ммоль на клетки линии Jurkat в течение 24 ч не сопровождалось интенсификацией апоптотической гибели клеток ( $p > 0,05$ ). Инкубация клеток с 50 и 100 ммоль SNP приводила к уменьшению числа аннексин-положительных клеток (до 0,40 (0—0,90)% и 0,30 (0—0,60)% соответственно) по сравнению с контролем (4,45 (1,45—8,50)%,  $p < 0,05$ ). При этом обращало на себя внимание резкое увеличение количества клеток с некротическими признаками — до 84,00 (54,60—84,40)% при действии SNP в концентрации 10 ммоль, до 95,80 (86,35—100)% — в концентрации 50 ммоль и до 99,40 (95,40—100)% — в концентрации 100 ммоль по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ). При действии SNP в концентрациях 10, 50 и 100 ммоль программированная гибель мононуклеарных лейкоцитов снижалась до 12,30 (8,95—15,55)%; 5,85 (4,75—6,65)% и 3,3 (2,75—4,60)% соответствен-

но, при 32,20 (18,80—35,40)% в контроле ( $p < 0,05$ ). Уменьшение числа аннексин-положительных клеток при инкубации их с SNP в концентрациях 10, 50 и 100 ммоль сопровождалось увеличением количества некротически измененных мононуклеарных лейкоцитов соответственно до 71,65 (65,15—81,35)%; 71,60 (64,65—73,95)% и 80,75 (73,65—87,05)% при 0,45 (0,35—0,75)% в контроле ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Интенсификация некроза является результатом токсического действия оксида азота, реализующегося при непрерывном и длительном контакте данного газа с клетками.

Действие сульфида водорода в концентрациях 10, 50 и 100 ммоль в течение 15 мин не приводило к увеличению числа клеток с признаками некроза в культуре Т-лимфобластной лейкемии и в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров ( $p > 0,05$ ) (табл. 2, 3).

Показано, что проапоптотический эффект сульфида водорода в высоких миллимолярных концентрациях сопровождается генерацией активных форм кислорода, снижением содержания глутатиона и вовлечением как рецепторного (Fas-опосредованного), так и митохондриального путей реализации программированной клеточной гибели. Действие более низких (милли- и микромолярные) концентраций газа может приводить к цитопротективному (антинекротическому и антиапоптотическому) или проапоптотическому эффекту в зависимости от типа клеток и условий эксперимента [6]. В проведенном исследовании интенсификация апоптотического процесса в культуре клеток линии Jurkat происходила при воздействии 10 и 100 ммоль NaHS (до 9,70 (8,83—14,90)%

и 13,20 (10,00—16,80)% соответственно) по сравнению с контролем (4,45 (1,45—8,50)%,  $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Таблица 2

Содержание клеток линии Jurkat с некротическими и апоптотическими признаками после 15-минутного и 24-часового воздействия различных концентраций донора сульфида водорода ( $Me (Q_1—Q_3)$ )

Время воздействия	Концентрация NaHS, ммоль	Содержание клеток линии Jurkat, %	
		с некротическими признаками	с апоптотическими признаками
Интактные клетки		0 (0—0,15)	4,45 (1,45—8,50)
15 мин	10	0,15 (0,10—0,30)	9,70* (8,83—14,90)
	50	0,15 (0,05—0,30)	8,35 (8,75—11,20)
	100	0,20 (0,15—0,30)	13,20* (10,00—16,80)
24 ч	10	2,30* (2,15—2,55)	3,67 (3,04—4,31)
	50	5,60* (3,75—9,15)	5,32 (4,75—5,94)
	100	13,30* (8,95—46,05)	5,48 (4,82—6,26)
		(p < 0,05)	

\*  $p < 0,05$  по сравнению с интактной культурой.

Таблица 3

Содержание мононуклеарных лейкоцитов с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24-часового воздействия различных концентраций донора сульфида водорода ( $Me (Q_1—Q_3)$ )

Время воздействия	Концентрация NaHS, ммоль	Содержание мононуклеарных лейкоцитов, %	
		с некротическими признаками	с апоптотическими признаками
Интактные клетки		0,45 (0,35—0,75)	32,20 (18,80—35,40)
15 мин	10	0,05 (0—0,10)	33,10 (30,07—41,50)
	50	0,12 (0—0,15)	41,75 (33,10—47,10)
	100	0,10 (0—0,10)	40,95 (35,10—45,10)
24 ч	10	59,10** (46,50—73,15)	25,60 (15,25—39,05)
	50	89,90** (78,45—97,30)	7,65* (2,05—15,35)
	100	97,95** (89,60—99,05)	1,70* (0,65—8,00)

\*  $p < 0,05$  по сравнению с интактной культурой.

\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с интактной культурой.

Показано, что  $H_2S$  может запускать программированную гибель клеток с вовлечением митохондриального пути индукции апоптоза, активацией каспазы 3 и семейства MAP-киназ [2, 3]. 24-часовая инкубация с NaHS в конечной концентрации 10, 50 и 100 ммоль не приводила к изменению числа аннексин-положительных клеток линии Jurkat по сравнению с аналогичными показателями в контроле ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Воздействие донора сульфида водорода в концентрациях 10, 50 и 100 ммоль в течение 15 мин не влияло на программированную гибель мононуклеарных лейкоцитов ( $p > 0,05$ ). Содержание аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов снижалось до 7,65 (2,05—15,35)% при воздействии 50 ммоль и до 1,70 (0,65—8,00)% при воздействии 100 ммоль донора сульфида водорода по сравнению с контролем (32,20 (18,80—35,40)% ( $p < 0,05$ )) на фоне увеличения количества клеток с некротическими признаками (табл. 2, 3).

Одной из причин токсического влияния сульфида водорода является разобщение окислительного фосфорилирования и ингибирование функционирования митохондрий [12].

### Заключение

При воздействии донора оксида азота в концентрации 100 ммоль в течение 15 мин число апоптотически измененных клеток линии Jurkat увеличивалось. NaHS обладал проапоптотическим эффектом в отношении клеток линии Jurkat, проявляющимся после 15 мин инкубации клеток *in vitro* в концентрациях 10 и 100 ммоль. Показано, что воздействие на клетки Т-лимфобластной лейкемии донора сульфида водорода в течение 24 ч не приводило к изменениям программированной гибели клеток. Инкубация клеток линии Jurkat с донором оксида азота в конечных концентра-

циях 50 и 100 ммоль в течение 24 ч сопровождалось снижением числа апоптотически измененных клеток.

Реализация программированной гибели мононуклеарных лейкоцитов не изменялась после 15 мин воздействия доноров газов сульфида водорода и оксида азота. Указанные газовые транзиттеры обладали антиапоптотическим эффектом в отношении мононуклеарных лейкоцитов после 24 ч инкубации последних с SNP и NaHS в концентрациях 10, 50 и 100 ммоль на фоне резкого возрастания числа некротизированных клеток.

Таким образом, газовые посредники сульфид водорода и оксид азота способны оказывать модулирующий эффект на программированную гибель клеток. Конечный эффект воздействия газов на апоптоз определяется типом исследуемых клеток, а также концентрацией и временем воздействия газовых транзиттеров на клетки.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральных целевых программ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы» (ГК № 16.512.11.2087), «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы» (ГК № 02.740.11.0311 и ГК № П1311).*

#### Литература

1. Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Стариков Ю.В. и др. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. Т. 146, № 12. С. 646—650.
2. Adhikari S., Bhatia M. H<sub>2</sub>S induced pancreatic acinar cell

- apoptosis is mediated via Jnk and p38 MAP kinase // J. Cell. Biol. Med. 2007. V. 12. № 4. P. 1374—1383.
3. Baskar R., Li L., Moore P. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and change in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells // The FASEB Journal. 2007. V. 21. P. 247—255.
4. Hemish J., Nakaya N., Mittal V. et al. Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 42321—42329.
5. Hortelano S., Dalloporta B., Zamzami N. et al. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition // FEBS Letters. 1997. V. 410. P. 373—377.
6. Leffler C., Parfenova H., Jagger J. et al. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation // J. Appl. Physiol. 2006. V. 100. P. 1065—1076.
7. Lowiska E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) — the third gas of interest of pharmacologists // Pharmacological reports. 2007. V. 59. P. 4—24.
8. Olson S., Garban H. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer // Nitric Oxide. 2008. V. 19. P. 1—14.
9. Rinaldi L., Gobbi G., Pambianco M. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3 // Laboratory Investigation. 2006. V. 86. P. 391—397.
10. Thomas D., Ridnour L., Isenberg J. et al. The chemical biology of nitric oxide. Implications in cellular signaling // Free Radic. Biol. Med. 2008. V. 45. P. 1—31.
11. Tuteja N., Chandra M., Tuteja R. et al. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology // J. Biomed. Biotechnol. 2004. № 4. P. 227—237.
12. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide // Antioxid Redox Signal. 2003. V. 5. P. 493—501.

Поступила в редакцию 01.03.2011 г.

Утверждена к печати 20.09.2011 г.

#### Сведения об авторах

**Е.Г. Старикова** — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Н.В. Рязанцева** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

**В.В. Новицкий** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Л.А. Таширева** — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Ю.В. Стариков** — канд. мед. наук, интерн кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

**Е.А. Степовая** — д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии СибГМУ (г. Томск).

#### ***Экспериментальные и клинические исследования***

***И.А. Осихов*** — студент 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

***О.А. Васильева*** — канд. мед. наук, ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

***В.Д. Якушина*** — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

#### **Для корреспонденции**

***Старикова Елена Григорьевна***, тел.: 8-906-951-7897, 8 (3822) 24-37-81; e-mail: to-elen@yandex.ru